

dr Monika Frączek

ZAŁĄCZNIK nr 3

AUTOREFERAT

Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

Poznań 2016

1. Imię i nazwisko

Monika Frączek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem miejsca i roku ich uzyskania wraz z tytułem rozprawy doktorskiej

16.07.1997 – magister analityki medycznej; Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ związków polifenolowych na aktywność mikrosomalnych monooksygenaz”. Promotor: dr Jerzy Gnojkowski. Praca zajęła I miejsce w 33. Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego AM w Poznaniu.

07.02.2006 – doktor nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna; Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Stan zapalny w męskim układzie rozrodczym a metabolizm tlenowy plemników”. Promotor: prof. dr hab. med. Maciej Kurpisz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1997-1998	Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu Wolontariat
1998-1999	Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu Studium doktoranckie przy Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
1999-2003	Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu Stanowisko: asystent
2003-2007	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu Stanowisko: asystent
2008-nadal	Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu Stanowisko: adiunkt

4. Dorobek naukowy

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 38 publikacji naukowych, w tym:

- 22 prace oryginalne; w 9 pracach jestem pierwszym autorem, w 2 drugim autorem na prawach pierwszego, w 4 drugim autorem,
- 8 prac przeglądowych; w 4 pracach jestem pierwszym autorem,
- 7 rozdziałów w książkach; w 4 rozdziałach jestem pierwszym autorem,
- 1 praca redakcyjna.

Jestem autorem 18 komentarzy publikowanych on-line dla grupy *Faculty of 1000 in Medicine*.

Jestem także autorem 83 doniesień konferencyjnych, w tym:

- 42 doniesienia międzynarodowe (19 doniesień ustnych)
- 41 doniesienia krajowe (30 doniesień ustnych)

Łączny *Impact Factor* opublikowanych prac według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: 61,408 (w tym 31,708 prac z pierwszym autorstwem).

Łączna liczba punktów MNiSW: 671 (w tym 334 prac z pierwszym autorstwem)

Liczba cytowań według bazy Web of Science (WoS): 378

Liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science (WoS): 316

Index Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 11

Dane z dnia 31.08.2016

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

MECHANIZMY PATOGENETYCZNE INFEKCJI BAKTERYJNYCH W NASIENIU LUDZKIM. POTENCJALNE BIOMARKERY ZAPALNE W NASIENIU.

Podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest cykl 6 publikacji (w tym 5 prac oryginalnych i 1 praca przeglądowa)

Prace oryginalne:

1. **Frączek M**, Piasecka M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kazienko A, Lenart S, Laszczyńska M, Kurpisz M. Membrane stability and mitochondrial activity of human-ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. *Andrologia*. 2012, 44:315-329 (**IF**=1,748; **MNiSW**=15)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, zbieraniu materiału biologicznego do badań, wykonaniu badań seminologicznych, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych, współudziale w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, współudziale w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

2. **Frączek M**, Wiland E, Piasecka M, Boksa M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kolanowski T, Beutin L, Kurpisz M. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. *Fertil Steril*. 2014, 102:711-719.e1. (**IF**=4,590; **MNiSW**=45)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, zbieraniu materiału biologicznego do badań, współudziale w wyko-

naniu badań seminologicznych, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

3. **Frączek M**, Hryhorowicz M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kolanowski T, Beutin L, Kurpisz M. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during *in vitro* semen bacterial infection. *J Assist Reprod Genet.* 2015, 32:771-779 (IF=1,858; MNiSW=20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, zbieraniu materiału biologicznego do badań, współudziale w wykonaniu badań seminologicznych, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4. **Frączek M**, Hryhorowicz M, Gill K, Zarzycka M, Gaczarzewicz D, Jedrzejczak P, Bilinska B, Piasecka M, Kurpisz M. The effect of bacteriospermia and leukocytospermia on conventional and nonconventional semen parameters in healthy young normozoospermic males. *J Reprod Immunol.* 2016 (<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jri.2016.08.006>) (IF=3,202; MNiSW=30)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, współudziale w zbieraniu materiału biologicznego do badań, współudziale w wykonaniu badań seminologicznych, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

5. Piasecka M*, **Frączek M***, Gaczarzewicz D, Gill K, Szumala-Kakol A, Kazienko A, Laszczynska M, Lenart S, Beutin L, Kurpisz M. Novel morphological findings of human sperm removal by leukocytes in *in vivo* and *in vitro* conditions: preliminary study. *Am J Reprod Immunol.* 2014, 72(4):348-358 (IF=2,438; MNiSW=30)

*Równy wkład autorów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, zbieraniu materiału biologicznego do badań, wykonaniu badań seminologicznych, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań morfologicznych przeprowadzonych w mikroskopie świetlnym i skaningowym, współudziale w interpretacji uzyskanych wyników badań, współudziale w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

Praca przeglądowa:

6. **Frączek M**, Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015, 53: 201-217 (IF=1,060; MNiSW=15).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu przeglądu literatury, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

Łączny *Impact Factor* prac zgłaszanych jako osiągnięcie zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 14,896; MNiSW=155

Wyniki zawarte w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego uzyskano w ramach realizacji projektu badawczego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N407 283539, którego byłam kierownikiem oraz częściowo z projektu rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr N R13 0066 06, którego byłam głównym wykonawcą.

5.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Według najnowszych danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), problem niepłodności dotyczy około 15% par starających się o potomstwo. W blisko 50% wszystkich przypadków, czynnikiem odpowiedzialnym za trudności w prokreacji jest tzw. czynnik męski. U mężczyzn, przyczyny obniżonej płodności są dość liczne i obejmują: wady genetyczne, wrodzone, rozwojowe, zaburzenia hormonalne, immunologiczne, stany zapalne oraz czynniki środowiskowe. Pomimo znajomości wielu przyczyn niepłodności męskiej, obecnie uprawiana diagnostyka andrologiczna aż w 20-30% mężczyzn nie pozwala ustalić czynnika etiologicznego. Wobec intensywnego rozwoju technik wspomaganego rozrodu, opracowanie nowych algorytmów diagnostyki i terapii męskiej niepłodności jest wyzwaniem dla współczesnej andrologii. Dlatego też, wysiłki badaczy koncentrują się na poszukiwaniu nowych nieinwazyjnych markerów płodności.

Badanie nasienia, obok badania andrologicznego i wywiadu klinicznego, wciąż jest podstawowym narzędziem oceny czynnika męskiego niepłodności, chociaż możliwości konwencjonalnej analizy seminologicznej są mocno ograniczone i nie pozwalają na ocenę zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Słaba wartość predykcyjna obecnie stosowanych testów seminologicznych może wynikać z braku adekwatnej oceny struktur subkomórkowych plemnika, decydujących o jego funkcji biologicznej, które obejmują ocenę stanu integralności błon komórkowych, aktywności mitochondriów oraz integralności plemnikowego DNA. W tym kontekście, wnikliwe poznanie defektów plemnika może otworzyć nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne w upośledzonej płodności męskiej, a testy pozwalające na ocenę struktury i funkcji poszczególnych organelli plemnikowych są obecnie w toku opracowań na całym świecie.

W ostatnich latach zwraca się uwagę na wzrost częstości (>15%) występowania ostrych i przewlekłych stanów zapalnych w męskim układzie moczowo-płciowym u mężczyzn z zaburzoną płodnością. Z obserwacji klinicznych wynika, że ponad połowa pacjentów leczonych metodami wspomaganego rozrodu ma historię stanu zapalnego. Lokalne stany zapalne u mężczyzny zwykle występują bezobjawowo, a kliniczne skutki ich działania mają miejsce dopiero po czasie i często bez uchwytnej przyczyny, trudnej do identyfikacji w obecnie prowadzonej diagnostyce andrologicznej. Co więcej, rzadko obejmują tylko jeden gruczoł, co dodatkowo utrudnia ich diagnostykę i właściwą terapię. W licznych pracach eksperymentalnych i klinicznych potwierdzono, że proces zapalny może ograniczać płodność poprzez hamujący wpływ na spermatogenezę, może też uszkadzać funkcję dojrzałych gamet, a nawet powodować niedrożność struktur wyprowadzających nasienie. Zdecydowana większość ostrych i przewlekłych zapaleń

w męskim układzie moczowo-płciowym ma podłoże infekcyjne, a głównym czynnikiem etiologicznym jest czynnik bakteryjny.

Jakkolwiek kliniczne znaczenie infekcji bakteryjnych i ich wpływ na obniżenie płodności męskiej są powszechnie znane, to etiopatogeneza tych zaburzeń, jak również niekorzystne działanie poszczególnych typów i gatunków bakterii na gamety męskie są wciąż słabo udokumentowane. Większość danych literaturowych ujawniających negatywny wpływ bakterii na płodność męską dotyczy szczepów patogennych tj. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*. Wśród niekorzystnych skutków łączonych z działaniem tych patogenów na plemniki, wymienia się m. in. upośledzenie ruchliwości, zaburzenia reakcji akrosomalnej oraz prawidłowej morfologii. Najwięcej wątpliwości budzi jednak kliniczna rola bakterii saprofitycznych, często izolowanych z ejakulatów w liczbie patologicznej w związku z powszechnym problemem bakteryjnej kolonizacji i kontaminacji męskiego układu moczowo-płciowego. Kwestie najbardziej kontrowersyjne dotyczą trudności w oszacowaniu krytycznej liczby bakterii, powyżej której dochodzi do uszkodzenia gamet męskich (poziom bakteriospermii $\geq 1 \times 10^3$ CFU/mL lub $\geq 1 \times 10^4$ CFU/mL ejakulatu, według różnych źródeł). Problemem jest także brak jednorodności w sposobie identyfikacji poszczególnych grup drobnoustrojów w nasieniu, a niektóre laboratoria ograniczają się do posiewów nasienia, wyłącznie w kierunku bakterii tlenowych.

Infekcje bakteryjne w obrębie męskiego układu moczowo-płciowego są nieodłącznie związane z infiltracją aktywowanych leukocytów, głównie komórek fagocytarnych, do miejsca toczącego się procesu zapalnego. Tu pełnią funkcję pierwszej linii obrony przed patogenami i inicjują rozwój reakcji zapalnej. Postuluje się, że zapalna aktywacja fagocytów związana jest jednocześnie z niekorzystną i destrukcyjną aktywnością wobec gamet męskich, związaną z nagromadzeniem w otoczeniu plemników dużych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) czy innych aktywnych biologicznie substancji, takich jak proteazy czy cytokiny. Jakkolwiek, bezpośredni wpływ leukocytospermii ($\geq 1 \times 10^6$ leukocytów peroksydazo-dodatnich/mL ejakulatu) na zdolność zapładniającą plemników wciąż jest kwestią kontrowersyjną, zwłaszcza w kontekście istnienia jej związku z zaburzeniami plemników stwierdzanymi w standardowej analizie seminologicznej. Co więcej, w literaturze postulowana jest także korzystna rola leukocytów związana z eliminacją martwych i uszkodzonych plemników.

Pomimo prowadzonych od lat badań, brak jest przekrojowych opracowań, które pozwalają zrozumieć patofizjologiczny mechanizm odpowiedzialny za szkodliwy wpływ infekcji bakteryjnej w układzie moczowo-płciowym na płodność męską. W dotychczasowych nielicznych pracach eksperymentalnych i klinicznych sugeruje się udział apoptozy i stresu oksydacyjnego, jako potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie męskiej subpłodności/niepłodności związanej z lokalną infekcją bakteryjną. Jednakże do tej pory nie uzyskano pełnego obrazu zmian w ejakulowanych plemnikach ludzkich, będących efektem skoordynowanego działania ww. procesów i jednocześnie charakterystycznych dla poszczególnych mediatorów zapalnych. W tym kontekście, prezentowane opracowanie jest ambitne i nowatorskie.

Głównym celem podjętych badań było zatem:

- identyfikacja mechanizmów patogenetycznych infekcji bakteryjnych w nasieniu na podstawie niekonwencjonalnej charakterystyki ejakulowanych plemników ludzkich w warunkach bakteriospermii i/lub leukocytospermii oraz
- wytypowanie nowych biomarkerów najbardziej informatywnych dla diagnostyki i późniejszej terapii niepłodności związanej z infekcją bakteryjną nasienia.

Cel ten realizowano poprzez jednoczesną i kompleksową analizę struktur subkomórkowych plemnika, obejmujących ocenę integralności błon komórkowych, aktywności mitochondriów oraz integralności DNA, w środowisku bakterii i/lub leukocytów. Na potrzeby oceny każdego z tych mediatorów z osobna, badania przeprowadzono w dwóch niezależnych modelach badawczych tj. w różnych fazach infekcji bakteryjnej nasienia *in situ* oraz w autorskim modelu infekcji bakteryjnej nasienia *in vitro*, z zastosowaniem szczepów bakteryjnych izolowanych z nasienia reprezentowanych przez szczep uropatogeny (*E. coli*, serotyp O75:NHT) i dwa szczepy potencjalnie patogene, w tym szczep tlenowy (*Staphylococcus haemolyticus*) oraz beztlenowy (*Bacteroides ureolyticus*).

Publikacja nr 1

Frączek M, Piasecka M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kazienko A, Lenart S, Laszczynska M, Kurpisz M. Membrane stability and mitochondrial activity of human-ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with Escherichia coli, Staphylococcus haemolyticus and Bacteroides ureolyticus. Andrologia. 2012, 44:315-329 (IF=1,748; MNiSW=15)

Ważnym etapem rozwoju infekcji bakteryjnej jest przyleganie (adhezja) bakterii do powierzchni komórek gospodarza. Proces ten zachodzi przy udziale powierzchniowych struktur drobnoustrojów – adhezyn, które oddziałują ze specyficznymi receptorami eksponowanymi na powierzchni atakowanych komórek. Ilość i rodzaj adhezyn jest swoista dla gatunków, a nawet dla poszczególnych szczepów bakterii. Przyleganie bakterii do komórek somatycznych jest stosunkowo dobrze poznanym procesem na poziomie molekularnym, jednakże niewiele jest prac poświęconych temu zjawisku w odniesieniu do gamet męskich. Sugeruje się, że bogata w glikoproteiny i glikolipidy powierzchnia plemników również tworzy receptory specyficzne dla ligandów bakteryjnych (Monga and Roberts, 1994; Gallegos-Avila et al., 2009; Kaur and Prabha et al., 2013).

Wyniki badań mikroskopowo-elektronowych pierwszej z prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe jednoznacznie ujawniły adhezyjne właściwości wszystkich szczepów bakteryjnych zastosowanych w układzie modelowym *in vitro*, do regionu główki, wstawki i witki plemników. Mikrografie uzyskane w mikroskopie elektronowym skaningowym potwierdziły, że kontakt bakterii z plemnikami był bezpośredni i ścisły. Ujawniły również obecność plemników ze zmianami morfologicznymi na ich powierzchni, zwłaszcza w regionie akrosomu i wstawki. Szczególny rodzaj kontaktu zaobserwowano w przypadku uropatogennego szczepu *E. coli*. Komórki tej bakterii łączyły się z plemnikami poprzez włosowate struktury zwane fimbriami. Dla serotypu *E. coli* O75:HNT są to groźne fimbrie typu P, które wiążą się z receptorami glikolipidowymi komórek nabłonkowych, zwłaszcza układu moczowego.

W omawianej pracy, ekspozycja ejakulowanych plemników na czynnik infekcyjny w warunkach *in vitro*, w zasadniczy sposób wpłynęła również na obniżenie integralności błon komórkowych plemników, co wykazano w teście żywotności z zastosowaniem dwóch fluorochromów, SYBR-14 i jodku propidyny (PI) oraz poprzez ocenę asymetrii fosfolipidów błon w teście z użyciem lipofilnego fluorochromu, merocyjaniny 540. Zaburzeniom tym towarzyszyły defekty mitochondriów plemników związane z upośledzeniem procesów zależnych zarówno od potencjału błonowego (test z sondą mitochondrialną JC-1) jak i oksydoredukcyjnego (test cytochemiczny NADH-NBT) tych organelli komórkowych. Co więcej, wyniki badań przeprowadzonych w mikroskopie fluorescencyjnym z zastosowaniem potrójnej kombinacji fluorochromów SYBR-14/PI/JC-1 jednoznacznie wykazały, że w obecności różnych grup bakterii, spadek integralności błon oraz potencjału mitochondrialnego mogą w plemniku występować równocześnie.

Podsumowując, przeprowadzone badania są unikatowym uzupełnieniem nielicznych doniesień literaturowych wskazujących na powiązanie zmian ultrastrukturalnych ejakulowanych plemników z procesami degeneracyjnymi zachodzącymi w ich błonach komórkowych. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy po raz pierwszy donoszą o szkodliwym wpływie gronkowców koagulazoujemnych i beztlenowych pałeczek gram-ujemnych na procesy energetyczne w mitochondriach gamet męskich. Połączenie oceny mikroskopowo-elektronowej z defektami molekularnymi plemników pozwoliło na częściowe wyjaśnienie mechanizmu bakteryjnej patogenezy, związanego z adhezją komórek różnych typów bakterii do gamet męskich. Obserwacje te po raz kolejny zwracają uwagę na poważny problem, jakim jest kwestia kolonizacji męskiego układu rozrodczego przez wiele szczepów bakteryjnych.

Publikacja nr 2

Frączek M, Wiland E, Piasecka M, Boksa M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kolanowski T, Beutin L, Kurpisz M. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. Fertil Steril. 2014, 102:711-719.e1. (IF=4,590; MNiSW=45)

Kolejnym etapem badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy uszkodzenia błon komórkowych plemników w czasie infekcji bakteryjnej nasienia mogą bezpośrednio wpływać na ich funkcję biologiczną w warunkach *in vitro*. Analiza cytometryczna plemników wybarwionych SYBR-14 i PI oraz merocyjaniną 540 potwierdziła wcześniejsze wyniki uzyskane w eksperymentach z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (**publikacja nr 1**). Wszystkie zastosowane w pracy szczepy bakteryjne miały destrukcyjny wpływ na architekturę dwuwarstwy lipidowej błon, a zmianom tym towarzyszyło obniżenie parametru ruchliwości plemników. Uzyskane wyniki wskazują również na silne cytotoksyczne działanie szczepu beztlenowego na plemniki, niezależnie od tego czy był on stosowany samodzielnie czy łącznie z leukocytami. O związku *B. ureolyticus* z męską niepłodnością dyskutowano już na początku lat 90. ubiegłego stulecia. Sugerowano, że sam szczep lub jego toksyny oddziałują na morfologię plemników, ale patomechanizm był nieznany (Balmelli et al., 1994).

Powyższe wyniki znalazły potwierdzenie w teście hipoosmotycznym (HOS), w którym odsetki plemników żywych z prawidłową integralnością błon były statystycznie obniżone po inkubacji z bakteriami, zwłaszcza ze szczepem beztlenowym. Biorąc pod uwagę fakt, że hipoosmotyczny test

pęcznienia plemników pozwala określić nie tylko strukturalną integralność błon komórkowych, ale również ich zdolność do utrzymania właściwego gradientu osmotycznego, uzyskane wyniki w teście HOS wskazują na możliwość szkodliwego oddziaływania czynnika infekcyjnego nie tylko na strukturę, ale również na funkcję błon biologicznych plemników. Interesującym elementem przeprowadzonych badań było wykazanie licznych dodatnich korelacji pomiędzy odsetkami żywych plemników z zawiniętymi wtkami poddanych działaniu medium hipoosmotycznego i odsetkami plemników z prawidłową asymetrią lipidów błon komórkowych w teście z merocyjaniną 540.

W celu oceny zdolności zapładniającej plemników w omawianej pracy zastosowano test *in vitro* ksenogenicznej penetracji do oocytów chemicznych (ang. *sperm penetration assay*, SPA). Ten funkcjonalny test pozwala w warunkach laboratoryjnych określić zdolność plemników do kapacytacji, reakcji akrosomalnej, fuzji z oolemmą oraz dekondensacji własnego DNA w cytoplazmie oocytu, czyli zdolność do utworzenia przedjądrzy. Inkubacja plemników z poszczególnymi szczepami bakteryjnymi wiązała się ze statystycznie istotnym obniżeniem wartości testu penetracji w stosunku do plemników kontrolnych. Odsetek penetrowanych oocytów dodatkowo obniżał się po łącznej inkubacji plemników z bakteriami i leukocytami. Efekt ten najsilniej zaznaczył się w obecności szczepu beztlenowego, niezależnie od tego czy był zastosowany sam czy w kombinacji z leukocytami.

Uzupełnieniem kompleksowej oceny stanu uszkodzenia błon komórkowych plemników w badanej pracy była ocena stopnia peroksydacji lipidów błon poprzez oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (ang. *malondialdehyde*, MDA) w lizatach plemnikowych. Zgodnie z przewidywaniami, ekspozycja plemników na czynnik infekcyjny *in vitro* w zasadniczy sposób wpłynęła na procesy peroksydacji lipidów błon tych komórek, choć najsilniejszy destrukcyjny wpływ zanotowano w obecności leukocytów. Obserwowane wysokie stężenia MDA w mieszaninie koinkubacyjnej plemników i leukocytów, najprawdopodobniej były naturalną konsekwencją wysokich poziomów RFT produkowanych przez aktywowane leukocyty, co potwierdzają wcześniejsze badania własne (Frączek et al., 2007). Skutkiem działania stresu oksydacyjnego w środowisku leukocytów była obserwowana w pracy obniżona zdolność plemników do penetracji i fuzji z komórką jajową.

Podsumowując, niniejsza publikacja jest pierwszym doniesieniem, w którym skorelowano subkomórkowe zmiany w błonach biologicznych plemników zachodzących w czasie infekcji bakteryjnej nasienia z ich potencjałem rozrodczym. Uszkodzenie asymetrii dwuwarstwy lipidowej błon komórkowych plemników wydaje się być główną przyczyną zmian degeneracyjnych, które można przypisać zarówno bakteriom patogennym, jak i potencjalnie patogennym, jednocześnie krytycznych dla ich funkcji biologicznej. Obecność leukocytów w nasieniu nasila procesy peroksydacyjne w błonach biologicznych plemników do poziomów, przy których może dojść do obniżenia ich zdolności do penetracji komórek jajowych. W świetle uzyskanych wyników, ocena asymetrii rozkładu fosfolipidów błon komórkowych plemników może być ważną informacją dla prognozy szans na zapłodnienie i może stanowić znaczący krok w kierunku ustalenia nowych algorytmów diagnostycznych infekcji bakteryjnych w męskim układzie moczowo-płciowym.

Publikacja nr 3

Frączek M, Hryhorowicz M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kolanowski T, Beutin L, Kurpisz M. Can apoptosis and necrosis coexist in ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection. J Assist Reprod Genet. 2015, 32:771-9 (IF=1,858; MNiSW=20)

Obiecujące wyniki obserwacji mikroskopowych oraz analiz z użyciem cytometrii przepływowej, dotyczące żywotności, asymetrii lipidów błon oraz błonowego potencjału mitochondrialnego plemników (**publikacje nr 1 i 2**), zwróciły uwagę na udział procesu apoptozy i nekrozy gamet męskich w patogenezie infekcji bakteryjnej nasienia. Jakkolwiek apoptoza w nabłonku plemnikotwórczym jest naturalnym procesem regulującym liczbę plemników na wszystkich etapach ich rozwoju i jednym z mechanizmów eliminowania plemników nieprawidłowych, to apoptoza wysoko wyspecjalizowanych gamet męskich jest przedmiotem wielu kontrowersji co do jej przebiegu i istnienia, a opinie często są sprzeczne. Według najnowszej teorii, dojrzałe plemniki znajdują się w stanie gotowości poddania się apoptozie, która przebiega na drodze wewnątrzkomórkowej, uruchamianej przez wzrost produkcji RFT w łańcuchu mitochondrialnym (Koppers et al., 2011; Mitchell et al., 2011).

W dojrzałych plemnikach stwierdza się obecność markerów apoptozy typowych dla komórek somatycznych. Nieliczne dane literaturowe wskazują na proapoptotyczny wpływ kilku znanych patogenów na ejakulowane plemniki (Villegas et al., 2005; Satta et al., 2006). W omawianej pracy, dla pełnej oceny dynamiki procesu obumierania gamet męskich w środowisku zapalnym, po raz pierwszy przeprowadzono jednoczesną analizę klasycznych wykładników wszystkich etapów apoptozy (ocena błonowej translokacji fosfatydyloseryny, błonowego potencjału mitochondrialnego i fragmentacji DNA), w plemnikach inkubowanych z bakteriami i/lub leukocytami w warunkach *in vitro*. Wyniki tych badań wskazują, że różne gatunki bakterii są silnym bodźcem kierującym gamety męskie na drogę apoptozy. Zwiększeniu odsetka plemników z translokacją fosfatydyloseryny zawsze towarzyszył wzrost odsetka plemników z fragmentacją DNA, a wyniki uzyskane w teście JC-1 jednoznacznie przemawiają za zaangażowaniem mitochondriów w proces apoptozy plemników indukowany w środowisku zapalnym. Co ciekawe, spośród badanych szczepów bakteryjnych, większy efekt proapoptotyczny wykazano w obecności bakterii kolonizujących męski układ moczowo-płciowy. Obserwowana słabsza ekspresja wszystkich badanych markerów apoptozy w obecności zastosowanego uropatogenu potwierdziła, że patogeniczność *E. coli*, szczepu w stosunku do którego najlepiej udokumentowano szkodliwy wpływ na zdolność zapładniającą plemników, zależy od typu serologicznego (Boguen et al., 2014).

Zjawisko translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej jest związane z utratą asymetrii fosfolipidów błon komórkowych. Wyniki uzyskane w teście wiązania aneksyny V pozostają w zgodzie z uzyskanymi wcześniej danymi dotyczącymi architektury lipidów błon w teście z merocyjaniną 540 (**publikacje nr 1 i 2**). Ponadto, wspierają hipotezę, iż w ludzkich plemnikach, barwnik merocyjanina 540 jest markerem zmian degeneracyjnych błon związanych z procesem apoptozy (Muratori et al., 2004; Martin et al., 2005). Chociaż biologiczne znaczenie błonowej translokacji fosfatydyloseryny zachodzącej w plemnikach ludzkich nie jest do końca poznane, to wyniki uzyskane w omawianej pracy wskazują, że jej wzrost

w ejakulowanych plemnikach ekspozowanych na czynnik infekcyjny jest elementem zmian zachodzących w błonie komórkowej plemników, związanych z procesem apoptozy.

Dotychczasowe nieliczne prace dotyczące wpływu infekcji bakteryjnej nasienia na procesy apoptotyczne dojrzałych gamet męskich najczęściej pomijały aspekt zaburzeń integralności DNA. Z uwagi na nakładanie się apoptozy i nekrozy oraz trudności w rozróżnianiu tych dwóch procesów śmierci komórek, w omawianej pracy, do badania stopnia fragmentacji DNA plemników w czasie infekcji bakteryjnej nasienia w warunkach *in vitro*, zastosowano barwienie TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) według zmodyfikowanego protokołu z użyciem dodatkowego barwnika fluorescencyjnego do oznaczenia żywotności plemników (Mitchell et al., 2011). Pozwoliło to na oddzielną ocenę stopnia fragmentacji DNA w plemnikach żywych (efekt apoptozy) i w plemnikach martwych (efekt nekrozy). W zastosowanym modelu *in vitro* zaobserwowano wzrost odsetka plemników z pozytywną reakcją TUNEL, zarówno w komórkach żywych jak i martwych. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na jednoczesną indukcję apoptozy i nekrozy w ejakulowanych plemnikach w wyniku ich bezpośredniego kontaktu z bakteriami. Rezultaty te są molekularnym potwierdzeniem wyników badań ultrastrukturalnych innych badaczy, którzy obserwowali nieprawidłowe formy plemników, zarówno z cechami komórek apoptotycznych jak i nekrotycznych, w nasieniu pacjentów z lokalną infekcją bakteryjną lub z bakteryjną kontaminacją/kolonizacją w układzie moczowo-płciowym (Collodel et al., 2005; Moretti et al., 2009).

W niniejszej pracy zaobserwowano także wpływ leukocytów na procesy apoptotyczne i nekrotyczne plemników. Analiza porównawcza wyników uzyskanych dla plemników bez i po inkubacji z leukocytami wykazała bowiem, że tylko w teście TUNEL, zarówno w kontekście apoptozy jak i nekrozy, efekt leukocytów był statystycznie istotny. Zaobserwowany proapoptotyczny i pronekrotyczny efekt leukocytów na gamety męskie zależał od zastosowanego szczepu i był najsilniejszy w obecności szczepu *B. ureolyticus*. Można zatem wnioskować, że poszczególne grupy i typy bakterii z różną siłą aktywują leukocyty, decydując o stopniu nasilenia stresu oksydacyjnego i jego szkodliwym wpływie na plemniki.

Podsumowując, przeprowadzone badania nie pozostawiają wątpliwości, że mediatory zapalne (bakterie, leukocyty) indukują zarówno apoptozę jak i nekrozę w ejakulowanych plemnikach ludzkich. Należy w tym miejscu podkreślić, że po raz pierwszy udokumentowano proapoptotyczny i pronekrotyczny wpływ bakterii potencjalnie patogennych na ejakulowane plemniki. Jednak to, czy gameta męska zostanie skierowana na drogę apoptozy czy nekrozy, prawdopodobnie zależy od rodzaju czynnika inicjującego, czasu ekspozycji i indywidualnych predyspozycji na działanie stresu oksydacyjnego. Nie można wykluczyć wspólnej ścieżki końcowej procesu apoptozy i nekrozy w plemnikach w czasie lokalnej infekcji bakteryjnej. Wobec uzyskanych w pracy wyników, należy również wziąć pod uwagę teorię nekrozy jako końcowego etapu procesu apoptozy plemników, indukowanego czynnikiem infekcyjnym. Jakkolwiek wyjaśnienie tego zjawiska i zrozumienie mechanizmu nekrozy w plemnikach wymaga dalszych badań.

Wobec poważnych konsekwencji zwiększonej fragmentacji DNA w żywych plemnikach (obniżenie zdolności plemników do zapłodnienia, obniżenie możliwości dekondensacji genomu plemnika w komórce jajowej, nieprawidłowy wczesny rozwój zarodka, zwiększone ryzyko przeniesienia wad

genetycznych na potomstwo), otrzymane rezultaty mogą stanowić ważną wskazówkę praktyczną dla ustalenia nowych rekomendacji w zakresie przygotowania nasienia do rozrodu wspomaganego, ukierunkowanych na wykluczenie subklinicznej obecności drobnoustrojów podczas stosowanej procedury oraz selekcję plemników bez markerów apoptozy.

Publikacja nr 4

Frączek M, Hryhorowicz M, Gill K, Zarzycka M, Gaczarzewicz D, Jedrzejczak P, Bilinska B, Piasecka M, Kurpisz M. *The effect of bacteriospermia and leukocytospermia on conventional and nonconventional semen parameters in healthy young normozoospermic males. J Reprod Immunol. 2016 (<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jri.2016.08.006>) (IF=3,202; MNiSW=30)*

W kolejnej pracy prezentowanej jako osiągnięcie naukowe podjęto próbę weryfikacji wyników uzyskanych w modelowym układzie infekcji bakteryjnej nasienia w warunkach *in vitro* (**publikacje nr 1-3**) i zaproponowano analizę szerokiego panelu konwencjonalnych (standardowa analiza seminologiczna) i niekonwencjonalnych (struktury subkomórkowe plemników) parametrów w nasieniu mężczyzn z bezobjawową bakteriospermią i/lub leukocytospermią *in situ*. Oryginalnym elementem podjętych badań było oszacowanie wzajemnych zależności pomiędzy parametrami konwencjonalnymi i niekonwencjonalnymi plemników, w celu identyfikacji mechanizmów odpowiedzialnych za procesy degeneracyjne indukowane w gametach męskich, w różnych fazach infekcji bakteryjnej nasienia. W dostępnym piśmiennictwie naukowym spotyka się rozbieżności dotyczące wpływu bakteriospermii i leukocytospermii na dojrzałe plemniki, a nieliczne do tej pory badania kliniczne na ten temat, były przeprowadzone na różnych grupach mężczyzn nieplodnych. W niniejszej pracy, dla oceny rzeczywistego wpływu bakterii i leukocytów na plemniki, po raz pierwszy, badania przeprowadzono na nie selekcyjowanej grupie zdrowych mężczyzn w wieku reprodukcyjnym. Wszyscy uczestnicy badań mieli normozoospermię, w zakresie koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników, według rekomendacji WHO z 2010 roku (WHO, 2010). Na podstawie testów weryfikujących obecność bakterii lub leukocytów w nasieniu w liczbie patologicznej, lub też obu tych czynników jednocześnie, badanych mężczyzn kwalifikowano do jednej z 4 podgrup badawczych: grupy kontrolnej (bez mediatorów zapalnych) oraz trzech grup reprezentujących kolejne fazy infekcji bakteryjnej w nasieniu czyli grupy mężczyzn z izolowaną bakteriospermią (faza I), z bakteriospermią współwystępującą z leukocytospermią (faza II) i grupy z izolowaną leukocytospermią (faza III).

Analiza mikrobiologiczna ejakulatów wykazała znaczne rozpowszechnienie występowania drobnoustrojów (pomimo braku klinicznych wykładników infekcji) w liczbie patologicznej przekraczającej 1×10^4 /mL. Co więcej, aż u 76% badanych mężczyzn stwierdzono występowanie w nasieniu więcej niż jednego typu drobnoustroju w liczbie patologicznej. Najczęściej izolowano szczepy bakteryjne rzadko uznawane za patogenne dla plemników, należące do grupy paciorkowców i gronkowców koagulazo-ujemnych. Uwagę zwraca również fakt, że obecność bakterii beztlenowych stwierdzono aż w 20% dodatnich posiewów. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi przez nielicznych badaczy, którzy w analizie mikrobiomu plazmy nasiennej, z dużą częstością identyfikowali gatunki bakterii saprofitycznych, zarówno w ejakulatach zdrowych mężczyzn jak i nieplodnych (Hou et al., 2013). W świetle prezentowanych danych, a także na podstawie wyników uzyskanych w układzie modelowym *in vitro*, kliniczne znaczenie bakterii

często kolonizujących męski układ moczowo-płciowy i jednocześnie uznawanych za potencjalnie niepatogenne w stosunku do gamet męskich, wciąż pozostaje kwestią otwartą. W aspekcie praktycznym, uzyskane wyniki wskazują na konieczność podjęcia kroków w kierunku ujednolicenia profilu diagnostycznego rutynowej analizy mikrobiologicznej nasienia (potencjalnie z włączeniem bakterii beztlenowych), zwłaszcza u pacjentów z zaburzoną płodnością i kwalifikowanych do leczenia metodami wspomaganego rozrodu.

Bezpośredni związek bakteriospermii i leukocytospermii z nieprawidłowościami plemników stwierdzanymi w standardowej analizie seminologicznej jest szeroko dyskutowany w literaturze, a opinie często wykluczają się (Gdoura et al., 2007; Domes et al., 2012; Sellami et al., 2014). W niniejszej pracy zaobserwowano istotne obniżenie koncentracji, ruchliwości i/lub prawidłowej morfologii plemników, zarówno w ejakulatach z bakteriospermią jak i leukocytospermią, w stosunku do grupy kontrolnej. Interesująca jest także obserwacja silnie obniżonej integralności błon w teście HOS w ejakulatach z pozytywnym posiewem mikrobiologicznym. Należy w tym miejscu podkreślić, że postulowana w warunkach infekcji bakteryjnej *in vitro* (**publikacja nr 2**), dodatnia korelacja testu HOS z zaburzeniami asymetrii fosfolipidów błon komórkowych w teście z merocyjaniną 540, w prezentowanej pracy została potwierdzona w grupie z izolowaną bakteriospermią. Wyniki uzyskane w obu układach doświadczalnych, z jednej strony potwierdzają poprawność wykreowanego modelu *in vitro*, z drugiej zaś stanowią wystarczającą przesłankę do stwierdzenia, że w czasie infekcji bakteryjnej nasienia, procesy degeneracyjne w błonach komórkowych plemników, jednocześnie krytyczne dla jej funkcji biologicznej, zachodzą już w początkowej fazie infekcji. W świetle przedstawionych danych, ocena asymetrii błon komórkowych plemników może stać się użytecznym narzędziem we wczesnej diagnostyce bezobjawowych infekcji bakteryjnych nasienia, choć sugestia ta wymaga potwierdzenia na większej grupie mężczyzn.

Analiza parametrów subkomórkowych plemników ujawniła ich „apoptotyczny fenotyp”, zwłaszcza w ejakulatach z bakteriospermią. Świadczą o tym licznie stwierdzane nieprawidłowości w plemnikach w obecności czynnika infekcyjnego, obejmujące jednocześnie wzrost błonowej translokacji fosfatydyloseryny, spadek potencjału mitochondrialnego i wzrost fragmentacji plemnikowego DNA w plemnikach żywych. Wyniki analizy porównawczej pomiędzy parametrami konwencjonalnymi i niekonwencjonalnymi okazały się bardzo interesujące i w grupie mężczyzn z izolowaną bakteriospermią ujawniły szereg istotnych statystycznie zależności pomiędzy standardowymi parametrami seminologicznymi (koncentracja, ruchliwość, morfologia, wskaźnik teratozoospermii), a błonowym potencjałem mitochondrialnym plemników. Ponadto, wyniki te korespondują z danymi uzyskanymi w układzie modelowym *in vitro*, w którym inkubacja plemników z bakteriami (a nie z leukocytami) również związana była ze statystycznie istotnym obniżeniem potencjału mitochondrialnego plemników w teście z fluorochromem JC-1 (**publikacja nr 3**). Rezultaty te są silnym argumentem, który przemawia za zaangażowaniem mitochondriów w mechanizm szkodliwego działania bakterii patogennych i potencjalnie patogennych na ejakulowane plemniki ludzkie. Hipotezę tę dodatkowo wspiera obserwowana w pracy obniżona aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów w ejakulatach z bakteriospermią, którą wykazano również po inkubacji plemników z bakteriami (**publikacja nr 1**). Reasumując, powyższe

obserwacje potwierdzają akceptowany w literaturze pogląd na temat roli aktywności mitochondriów w określeniu potencjału zapładniającego gamet męskich (Espinoza et al., 2009). Rzucają też nowe światło na możliwości zastosowania oceny błonowego potencjału mitochondrialnego plemników, jako markera subpłodności/niepłodności związanej z infekcją bakteryjną nasienia.

Podobnie jak w układzie modelowym *in vitro*, przeprowadzone badania w układzie *in vivo* zwróciły również uwagę na udział procesu nekrozy jako jednego z mechanizmów szkodliwego działania bakteriospermii i leukocytospermii na ejakulowane plemniki. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny zaobserwowano w II fazie infekcji bakteryjnej nasienia. Już w standardowej ocenie seminologicznej wykazano najniższą żywotność plemników w grupie mężczyzn z bakteriospermią współwystępującą z leukocytospermią, której towarzyszyły najwyższe odsetki plemników z fragmentacją DNA, zarówno w komórkach żywych jak i martwych. Co więcej, dodatkowo przeprowadzona analiza zależności statystycznej pomiędzy badanymi parametrami ujawniła w tej grupie badawczej silne ujemne korelacje koncentracji plemników z integralnością ich błon komórkowych w teście z SYBR-14 i PI oraz stopniem fragmentacji DNA w plemnikach żywych i martwych. Najbardziej prawdopodobny mechanizm wzmożonej śmierci plemników w rozwiniętej infekcji bakteryjnej nasienia, może być związany z destrukcyjnym wpływem stresu oksydacyjnego, którego głównym źródłem są aktywowane leukocyty. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy częściowo wspierają, szeroko propagowaną w ostatnim czasie w piśmiennictwie, hipotezę apoptozy (niewykluczone, że dotyczy ona także nekrozy) plemników indukowanej stresem oksydacyjnym (Muratori et al., 2015).

Za wolnorodnikowym mechanizmem cytotoksycznego działania leukocytospermii wobec gamety męskiej przemawiają również wyniki niekonwencjonalnych parametrów plemników, dotyczące procesów peroksydacyjnych błon komórkowych i aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów. W niniejszej pracy, poziom peroksydacji lipidów błon określano poprzez oznaczanie stężenia MDA zarówno w plazmie nasiennej jak i lizatach plemnikowych. Uzyskane wyniki różniły się dynamiką zmian w poszczególnych kompartmentach. W ocenie stężenia MDA w plazmie nasiennej nie zauważono różnic pomiędzy grupami badawczymi, natomiast stężenie MDA związanego z błoną komórkową stopniowo wzrastało w kolejnych fazach infekcji bakteryjnej, by osiągnąć najwyższe i statystycznie istotne wartości w grupie z izolowaną leukocytospermią. W prezentowanej pracy nie zaobserwowano również zależności pomiędzy stężeniem MDA w plazmie nasiennej, a standardowymi parametrami seminologicznymi plemników w poszczególnych grupach badawczych. Jakkolwiek zanotowano słabą korelację stężenia MDA w lizatach plemnikowych z parametrem morfologii w całej badanej populacji. Uzyskane wyniki, pozostają zatem w częściowej opozycji do wyników innych autorów, którzy w różnych grupach niepłodnych mężczyzn obserwowali statystycznie istotny związek obniżonych parametrów seminologicznych plemników z wysokimi poziomami MDA w plazmie nasiennej (Hsieh et al., 2006; Shamsi et al., 2010; Atig et al., 2012; Collodel et al., 2015). Te różnice tłumaczy fakt, że w prezentowanej pracy, analizy przeprowadzono w grupie zdrowych młodych mężczyzn z normozoospermią. We wcześniejszych badaniach autorskich wykazano bowiem, że plemniki o prawidłowej charakterystyce seminologicznej skuteczniej neutralizacją RFT generowane przez leukocyty, przy pomocy sprawnego własnego wewnątrzkomórkowego systemu obrony, który w warunkach

naturalnych dodatkowo wspierany jest przez antyoksydacyjne właściwości plazmy nasiennej (Frączek et al., 2004). Niewykluczone, że obserwowane wcześniej wyższe poziomy peroksydacji lipidów błon w układzie modelowym *in vitro* (**publikacja nr 2**) były związane z koniecznością prowadzenia takich badań na wyselekcjonowanych plemnikach, z pominięciem plazmy nasiennej. Łącząc powyższe wyniki z tymi uzyskanymi w niniejszej pracy, można zasugerować, że aby doszło do wzrostu poziomu MDA w plazmie nasiennej, istotnego dla wykrywalnych zmian w podstawowych parametrach seminologicznych, działanie stresu oksydacyjnego musi być bardziej nasilone. W związku z powyższym, wątpliwości budzi sugerowana przez niektórych autorów rola oznaczania stężenia MDA w plazmie nasiennej jako markera diagnostycznego męskiej subpłodności/niepłodności związanej z infekcjami w układzie moczowo-płciowym (Collodel et al., 2015). W świetle otrzymanych wyników, oznaczanie stężenia całkowitego poziomu MDA w nasieniu może być podstawą do kwalifikacji niektórych pacjentów do suplementacji antyoksydacyjnej, jak również użytecznym narzędziem do monitorowania skuteczności takiej terapii i przywrócenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w nasieniu, zanim dojdzie do trwałego ograniczenia potencjału rozrodczego plemników przez stres oksydacyjny.

Podsumowując wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy, należy z całą pewnością stwierdzić, że potwierdzają one wyniki uzyskane w modelowym układzie bakteryjnej infekcji nasienia w warunkach *in vitro* i wskazują na możliwość bezpośredniego oddziaływania mediatorów zapalnych na parametry subkomórkowe gamety męskiej, potencjalnie krytyczne dla jej funkcji biologicznej w warunkach *in vivo*. W tym kontekście, bakterie są niezależnym induktorem uszkodzeń w plemnikach, a główny mechanizm szkodliwego oddziaływania różnych gatunków bakterii na gamety męskie związany jest z indukcją procesu apoptozy, zwłaszcza typu wewnątrzkomórkowego z udziałem mitochondriów. Z kolei leukocytospermia współdziała w pogłębianiu szkodliwego działania stresu oksydacyjnego na plemniki, nawet po wyeliminowaniu samego czynnika infekcyjnego. Pełne zrozumienie obu tych procesów w plemnikach i ich związek z wynikami zaprezentowanymi w niniejszej pracy, może w przyszłości umożliwić ich wykorzystanie w opracowaniu nowych schematów wczesnego wykrywania, a następnie leczenia infekcji bakteryjnych w nasieniu.

Publikacja nr 5

Piasecka M, Frączek M*, Gaczarzewicz D, Gill K, Szumala-Kakol A, Kazienko A, Laszczynska M, Lenart S, Beutin L, Kurpisz M. Novel morphological findings of human sperm removal by leukocytes in in vivo and in vitro conditions: preliminary study. Am J Reprod Immunol. 2014, 72(4):348-58 (IF=2,438; MNiSW=30)*

**równy wkład autorów*

Biologiczna natura i konsekwencje interakcji pomiędzy plemnikami i leukocytami wciąż pozostają w sferze badań. Z jednej strony postuluje się korzystną rolę leukocytów związaną z eliminacją martwych i nieprawidłowych form plemników na drodze „cichej” fagocytozy (ang. ‘*silent phagocytosis*’), bez wywoływania stanu zapalnego (Aitken and Baker, 2013). Ten rodzaj fagocytozy ma miejsce w nabłonku plemnikotwórczym w czasie spermatogenezy oraz podczas masywnej infiltracji fagocytów po ejakulacji w żeńskich drogach rodnych. Z drugiej strony, infiltracja

zaktywowanych leukocytów, głównie komórek fagocytarnych, do miejsca toczącego się procesu zapalnego, wiąże się z niekorzystną i destrukcyjną aktywnością wobec gamet męskich, związaną z nagromadzeniem w otoczeniu plemników dużych ilości RFT i innych aktywnych biologicznie substancji, uczestniczących i nasilających proces zapalny (Sanocka et al., 2004; Aitken and Baker, 2013b). Sugeruje się, że następstwem licznych i zaawansowanych uszkodzeń plemników związanych z zapalną aktywacją leukocytów jest wzmożone ich usuwanie, co może mieć daleko idące implikacje kliniczne.

W publikacji oceniano procesy eliminacji ejakulowanych plemników ludzkich przez komórki zapalne, w mikroskopie świetlnym i elektronowym skaningowym. Analizy mikroskopowe przeprowadzone na plemnikach mężczyzn z leukocytospermią oraz plemnikach inkubowanych z leukocytami w liczbie patologicznej, potwierdziły eliminację gamet męskich na drodze klasycznej fagocytozy w wyniku bezpośredniego kontaktu (adhezji) komórek zapalnych do główki, wstawki i witki plemników oraz za pomocą wypustek cytoplazmatycznych (pierwszy etap procesu fagocytozy). Przeprowadzone badania, obok tradycyjnego fagocytowania plemników, ujawniły występowanie innego mechanizmu eliminacji gamet męskich, związanego z uwalnianiem przez komórki zapalne na zewnątrz własnego DNA, histonów oraz innych molekuł białkowych w formie unikatowych zewnątrzkomórkowych struktur – sieci (ang. *extracellular traps*, ET). Sugeruje się, że tworzenie ET związane jest ze śmiercią leukocytów, inną niż apoptoza czy nekroza, zwaną etozą (Brinkmann and Zychlinsky, 2012). Unikatowe obrazy mikroskopowe pokazały również, że te same komórki zapalne mimo zaangażowania w tworzenie ET były zdolne do równoczesnego przeprowadzenia fagocytozy plemników, co świadczy o dużej aktywności leukocytów prowadzącej do intensywnej eliminacji plemników w warunkach stanu zapalnego. Nasilenie obu tych procesów zaobserwowano w obecności patogenu, reprezentowanego w badaniach przez uropatogenny szczep *E. coli*, serotyp O75:NHT.

Proces etozy związanej z eliminacją gamet męskich, jak dotąd został opisany jedynie na modelu zwierzęcym. Uzyskane wyniki badań po raz pierwszy ujawniły współwystępowanie dwóch sposobów eliminacji plemników, fagocytozy i etozy, w ludzkim nasieniu zapalnym. Należy w tym miejscu podkreślić, że oba te mechanizmy są częścią wrodzonej odpowiedzi układu immunologicznego na proces zapalny i odgrywają kluczową rolę w eliminacji patogenów, a nieprawidłowości w ich przebiegu mogą prowadzić do poważnych patologii. Zaobserwowane w pracy wytwarzanie ET w kontakcie z plemnikami, sugeruje, że komórki te aktywują leukocyty w sposób podobny do czynnika infekcyjnego. W kontekście uzyskanych wyników, niekontrolowane wytwarzanie i usuwanie ET w nasieniu przypuszczalnie może stać przyczyną niepłodności partnerskiej.

Podsumowując, proces zapalny obejmuje kaskadę zdarzeń, w których zaangażowanych jest wiele komórek układu immunologicznego i rozrodczego. Wstępne wyniki przeprowadzonych badań morfologicznych po raz pierwszy pozwoliły na identyfikację procesu etozy w ludzkim nasieniu zapalnym, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Wyniki te znacznie wzbogacają wiedzę na temat procesu spermiofagii, chociaż jesteśmy dopiero na początku drogi poznawania tego istotnego, ale do tej pory niedocenianego procesu. Zrozumienie mechanizmów kontrolujących procesy

interakcji pomiędzy plemnikami i leukocytami może mieć w przyszłości znaczenie w oszacowaniu przyczyn męskiej subpłodności/niepłodności związanej z lokalnymi infekcjami.

Publikacja nr 6

Frączek M, Kurpisz M. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. Folia Histochem Cytobiol. 2015, 53: 201-217 (IF=1,060; MNiSW=15)

Uzupełnieniem cyklu moich prac doświadczalnych jest praca przeglądowa, w której podsumowano aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw patogenezy subpłodności/niepłodności związanej z infekcją bakteryjną nasienia. W oparciu o dane literaturowe i wyniki badań własnych, przedstawiono nowe poglądy na temat bezpośrednich i pośrednich procesów zaangażowanych w mechanizm szkodliwego oddziaływania głównych mediatorów zapalnych, bakterii i leukocytów, na gametę męską. W podsumowaniu artykułu zamieszczono schemat, będący autorską propozycją mechanizmów patogenetycznych infekcji bakteryjnych w nasieniu ludzkim, a zarazem syntezą wyników badań prac oryginalnych stanowiących osiągnięcie naukowe (**publikacje nr 1-5**).

Podsumowanie

Przeprowadzone badania są indywidualnym wkładem w rozwój naukowej i praktycznej wiedzy dotyczącej męskiej subpłodności/niepłodności związanej z infekcją bakteryjną w układzie moczowo-płciowym. Wyniki uzyskane w dwóch niezależnych układach badawczych dostarczyły wielu kluczowych informacji dotyczących patomechanizmów działania poszczególnych mediatorów zapalnych na gamety męskie. Wnioski wynikające z realizacji podjętych zadań, z jednej strony zweryfikowały wiele hipotez stawianych w literaturze naukowej w kontekście istnienia związku lokalnej infekcji bakteryjnej z męską niepłodnością, a z drugiej strony zwróciły uwagę na nowe procesy, które mogą być zaangażowane w mechanizm upośledzenia struktury i funkcji plemników w środowisku zapalnym. Uzyskane wyniki stanowią znaczący krok w kierunku wytypowania nowych biomarkerów bezobjawowych infekcji bakteryjnych w nasieniu, co daje możliwość ograniczenia ekspansji procesu zapalnego w układzie moczowo-płciowym, a po przebytej infekcji – powstania trwałych uszkodzeń w plemnikach. Wydaje się, że może to zwiększyć efektywność właściwego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego, a tym samym przyczynić się do zmniejszenia odsetka niepłodnych par.

Najważniejsze wnioski i rekomendacje wynikające z przeprowadzonych badań:

1. Obraz subkomórkowych zmian zachodzących w plemnikach w czasie infekcji bakteryjnej nasienia warunkuje ich potencjał rozrodczy.
2. Bakterie są niezależnym induktorem uszkodzeń w plemnikach. Główny mechanizm szkodliwego oddziaływania bakterii na ejakulowane plemniki ludzkie związany jest z indukcją apoptozy, zwłaszcza szlaku zależnego od mitochondriów.

3. Obecność leukocytów w nasieniu nasila procesy peroksydacyjne w błonach biologicznych plemników wpływając na obniżenie ich zdolności do penetracji komórek jajowych. Oznaczanie całkowitego stężenia MDA w nasieniu może być dobrym markerem zaburzeń równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w nasieniu, jednocześnie pomocnym w monitorowaniu skuteczności celowanego leczenia przeciwzapalnego i przywrócenia równowagi redox w nasieniu po przebytej infekcji bakteryjnej.
4. Stan asymetrii lipidów błon komórkowych plemnika może być wskaźnikiem istotnym w prognozowaniu szans na zapłodnienie i można sugerować jego uwzględnienie przy ustalaniu nowych rekomendacji diagnostycznych lokalnych infekcji bakteryjnych.
5. W nasieniu ludzkim, fagocytoza i etoza mogą współistnieć jednocześnie, a czynnik infekcyjny wzmacnia oba te procesy eliminacji plemników i tym samym może przyczyniać się do niepłodności partnerskiej.
6. Uzyskane wyniki sugerują konieczność wprowadzenia oceny mikrobiologicznej do rutynowej diagnostyki seminologicznej. Każdy pozytywny posiew mikrobiologiczny nasienia powinien być interpretowany ze szczególną uwagą, zwłaszcza u pacjentów z zaburzoną płodnością i kwalifikowanych do leczenia metodami wspomaganego rozrodu.

Wyniki zawarte w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe były prezentowane na wielu międzynarodowych i krajowych konferencjach, w formie 11 doniesień ustnych (7 wygłoszonych osobiście, w tym 2 wykłady na zaproszenie Polskiego Towarzystwa Andrologicznego i Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików) oraz 7 doniesień plakatowych.

W przyszłości planowane jest kontynuowanie badań mających na celu dalsze poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój subpłodności/niepłodności związanej z lokalnymi infekcjami. Doskonałym uzupełnieniem subkomórkowej charakterystyki plemników będzie biochemiczna, immunologiczna i oksydacyjna ocena plazmy nasiennej w celu poszukiwania nowych markerów infekcji bakteryjnych nasienia o wartości klinicznej. Planuje się również rozszerzenie badań o infekcje wirusowe, których znaczenie, jako przyczyny męskiej niepłodności jest w dużej mierze nieznane. Ze względu na ich zagrożenie dla zdrowia obojga partnerów i potomstwa, a także wysoki koszt badań wirusologicznych, warto zintensyfikować wysiłki w celu alternatywnego diagnozowania i leczenia wirusowych subklinicznych infekcji dróg moczowo-płciowych.

Piśmiennictwo

- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J Reprod Immunol.* 2013, 100:11-19.
- Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. *Int J Biol Sci.* 2012, 8:139-149.
- Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. *Bacteroides ureolyticus* in men consulting for infertility. *Andrologia.* 1994, 26:35-38.

- Boguen R, Uribe P, Treulen F, Villegas JV. Distinct isolates of uropathogenic *Escherichia coli* differentially affect human sperm parameters in vitro. *Andrologia*. 2014, 46:943-947.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012, 198:773-783.
- Collodel G, Baccetti B, Capitani S, Moretti E. Necrosis in human spermatozoa. I. Ultrastructural features and FISH study in semen from patients with uro-genital infections. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2005, 37:67-73.
- Collodel G, Moretti E, Micheli L, Menchiari A, Moltoni L, Cerretani D. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology*. 2015, 3:280-286.
- Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JB, Mazzulli T, Jarvi K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertil Steril*. 2012, 97:1050-1055.
- Espinoza JA, Schulz MA, Sánchez R, Villegas JV. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrologia*. 2009, 41:51-54.
- Frączek M, Sanocka D, Kurpisz M. Interaction between leucocytes and human spermatozoa influencing reactive oxygen intermediates release. *Int J Androl*. 2004, 27:69-75.
- Frączek M, Szumala-Kakol A, Jedrzejczak P, Kamieniczna M, Kurpisz M. Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertil Steril*. 2007, 88:1076-1085.
- Gallegos-Avila G, Ortega-Martínez M, Ramos-González B, Tijerina-Menchaca R, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G. Ultrastructural findings in semen samples of infertile men infected with *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmas. *Fertil Steril*. 2009, 91:915-919.
- Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect. Dis*. 2007, 7:129.
- Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, Abdo Z, Fonney LJ, Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013, 100:1261-1269.
- Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci*. 2006, 2:23-29.
- Kaur K, Prabha V. Impairment by sperm agglutinating factor isolated from *Escherichia coli*: receptor specific interactions. *Biomed Res Int*. 2013, 2013:548497.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J*. 2011, 436:687-698.

- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 2005, 20:3459-3468.
- Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl.* 2011, 34:2-13.
- Monga M, Roberts JA. Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J Androl.* 1994, 15:151-156.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, Collodel G. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26:47-56.
- Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl.* 2004, 25:797-810.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med.* 2015, 21:109-122.
- Sanocka D, Frączek M, Jedrzejczak P, Szumała-Kakol A, Kurpisz M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod Immunol.* 2004, 62:111-124.
- Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicari E, Salmeri M, Calogero AE. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod.* 2006, 21:134-137.
- Sellami H, Znazen A, Sellami A, Mnif H, Louati N, Ben Zarrouk S, Keskes L, Rebai T, Gdoura R, Hammami A. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and other sexually transmitted bacteria in semen of male partners of infertile couples in Tunisia: the effect on semen parameters and spermatozoa apoptosis markers. *PLoS One.* 2014, 9:e98903.
- Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Arora S, Arya DS, Talwar P, Sharma RK, Dada R. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys.* 2010, 47:38-43.
- Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis.* 2005, 10:105-110.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva, WHO Press, 2010.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje wczesne zainteresowania naukowe koncentrowały się wokół zagadnień biochemicznych, w szczególności dotyczących procesów oksydacyjno-redukcyjnych. Pierwsze kroki w tym temacie stawiałam pod czujnym okiem prof. dr hab. n. przyr. Władysława Fenrycha, autorytetu w dziedzinie biochemii medycznej, twórcy własnej szkoły badań luminescencyjnych metabolizmu tlenowego

komórek. W ramach pracy w Biochemicznym Kole Naukowym przy Zakładzie Biochemii Katedry Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, zajmowałam się badaniem przemian metabolicznych ksenobiotyków w organizmie. Z tą tematyką była związana również moja praca magisterska pt.: "Wpływ związków polifenolowych na aktywność mikrosomalnych monooksygenaz". Praca ta została zakwalifikowana do 33. Konkursu Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego AM w Poznaniu, na którym zajęła I miejsce.

Bezpośrednio po ukończeniu studiów dołączyłam do Zespołu Biologii Rozrodu Zakładu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, kierowanego przez prof. dr hab. med. Macieja Kurpisa. Tu pogłębiałam moje biochemiczne zainteresowania procesami wolnorodnikowymi w patofizjologii chorób człowieka i zostałam włączona do prowadzonych przez Zespół pionierskich prac nad badaniem udziału zjawiska stresu oksydacyjnego w niepłodności męskiej (nagroda Royan International Research Award w 2004 roku za cykl prac poświęconych tej tematyce). Jednym z istotnych osiągnięć tego programu badawczego było utworzenie współczynnika oksydowrażliwości, jako miary natężenia stresu oksydacyjnego w układzie enzymatycznych pro- i antyoksydantów nasienia u mężczyzn z normalnym i patologicznym spermogramem (**zał. 5; poz. IIA, 1, 3**). Wyniki te zachęciły mnie do rozszerzenia badań własnych nad rolą fenomenu stresu oksydacyjnego w nasieniu, towarzyszącego stanom zapalnym w męskim układzie moczowo-płciowym. W tym czasie zdobywałam doświadczenie w zakresie nowych technik badawczych wdrażanych przez Zespół, takich jak: wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC) i cytometria przepływowa, szkoląc się odpowiednio w Zakładzie Farmacji Klinicznej oraz Zakładzie Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Poznaniu. W swojej pierwszej publikacji oryginalnej udowodniłam przydatność metody HPLC do oznaczania zmian oksydacyjnych w lipidach błon biologicznych plemników dla lepszego zróżnicowania niektórych patologii nasienia (**zał. 5; poz. IID, 2**). W toku dalszych badań, opracowałam metodę detekcji wyrzutu tlenowego w mieszaninie ko-inkubacyjnej leukocytów i plemników, co zainicjowało prace nad stworzeniem nowatorskiego modelu stanu zapalnego w warunkach *in vitro*. Model ten pozwolił na obserwację wpływu mediatorów reakcji zapalnej (leukocyty, bakterie, cytokiny prozapalne) na jakościowe i ilościowe zmiany w metabolizmie tlenowym ejakulowanych plemników ludzkich, a wyniki tych badań zostały wykorzystane w mojej rozprawie doktorskiej pt.: „Stan zapalny w męskim układzie moczowo-płciowym a metabolizm tlenowy plemników”. Jednym z kluczowych osiągnięć przeprowadzonych badań było wykazanie, że w ejakulatach z prawidłowym spermogramem znajdują się subpopulacje plemników o odmiennych profilach oksydacyjno-redukcyjnych, które pozostają w ścisłej zależności od obecności leukocytów w nasieniu i stopnia ich aktywacji. Te badania eksperymentalne były jednymi z pierwszych, których wyniki wskazały na antyoksydacyjne właściwości plemników o prawidłowej morfologii i ruchliwości, w środowisku aktywowanych leukocytów. Badania ujawniły również pośredni udział cytokin prozapalnych w potęgowaniu skutków działania stresu oksydacyjnego na gamety męskie, zwłaszcza na błony komórkowe i DNA plemników izolowanych na gradiencie perkolu. Uzyskane wyniki zwróciły też uwagę na wpływ czynnika infekcyjnego w generowaniu stresu oksydacyjnego w nasieniu, związanego m. in. z peroksydacyjnym uszkodzeniem błon komórkowych plemników. Wyniki będące przedmiotem pracy doktorskiej zostały opublikowane w czterech prestiżowych czasopismach branżowych (*Fertility and Sterility*, *Journal of Andrology*, *International Journal of Andrology* i *Journal of Reproductive Immunology*)

w formie 5 prac oryginalnych (**zał. 5; poz. IIA, 2, 4, 6, 7, 15**) oraz w rozdziale książkowym (**zał. 5; poz. IID, 10**). Wyniki te podsumowałam w anglojęzycznym artykule przeglądowym (**zał. 5; poz. IIA, 5**). Na dzień dzisiejszy, artykuł ten jest najczęściej cytowaną publikacją w moim dorobku naukowym. Wyniki pracy doktorskiej były prezentowane na wielu krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych z dziedziny andrologii, biologii rozrodu, biochemii, biologii komórki i cytometrii przepływowej. Ich pionierski charakter i uznanie międzynarodowego środowiska naukowego potwierdzają dwie prestiżowe nagrody za doniesienie plakatowe, *The 2006 NIH Trainee Travel Award* i *The 2006 Lalor Foundation Travel Award*, przyznane przez Amerykańskie Towarzystwo Andrologiczne w Chicago w 2006 roku oraz wyróżnienie za ustną prezentację, przyznane przez Europejskie Towarzystwo Immunologii Rozrodu w Berlinie w 2007 roku. Wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej stały się punktem wyjścia i inspiracją do poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój męskiej subpłodności/niepłodności związanej z bakteryjnymi zakażeniami układu moczowo-płciowego. Realizacja tych badań stała się możliwa dzięki uzyskaniu finansowania w ramach dwóch projektów badawczych, przyznanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w 2009 roku oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2010 roku (**zał. 5; poz. II.I, 5, 8**). Wyniki tych badań zaowocowały powstaniem cyklu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Od wielu lat uczestniczę w programie badań epidemiologicznych dotyczących męskiej niepłodności. W latach 2006-2010 byłam jednym z głównych wykonawców zadania badawczego w wielośrodkowym projekcie zamawianym, dotyczącym epidemiologii zagrożeń prokreacyjnych w Polsce, kierowanym przez prof. dr hab. med. Wojciecha Hanke z Zakładu Epidemiologii Środowiskowej Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi (**zał. 5; poz. II.I, 4**). Celem badań była ocena wpływu poziomu hormonów, białek transportujących, wariantów receptora androgenowego i czynników środowiskowych na jakość nasienia w nie selekcyjowanej populacji młodych mężczyzn z różnych obszarów Polski. Badaniem objęto grupę 202 mężczyzn w wieku 18-35 lat. Niespodzianką okazały się wyniki badań dotyczące standardowej oceny seminologicznej nasienia, które pomimo dużych indywidualnych (osobniczych) różnic nie wykazały niepokojąco wysokiej liczby parametrów o wartościach niższych w stosunku do norm rekomendowanych przez WHO. Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, że inhibina B może być dobrym wykładnikiem procesu spermatogenezy i należy zastanowić się nad włączeniem oznaczenia tego markera do panelu badań podstawowych w andrologii. Podjęte badania po raz pierwszy wykazały dla polskiej populacji występowanie licznych korelacji pomiędzy polimorfizmami genu receptora androgenowego, a poziomami hormonów płciowych i czynników wzrostu w surowicy krwi (**zał. 5; poz. IIA, 19**). W ramach współpracy z Zakładem Immunologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Lwowie, uczestniczyłam również w badaniach, których celem była próba wyznaczenia trendu jakości nasienia młodych mężczyzn z obszaru Wielkopolski i okręgu Lwowskiego. Badania te wykazały niższą jakość nasienia młodych mężczyzn z zachodniej Ukrainy, w stosunku do przebadanej populacji polskiej. Zaobserwowano też wzrost częstości występowania bezobjawowej bakteriospermii i leukocytozpermii oraz markerów stresu oksydacyjnego w nasieniu mężczyzn z zachodniej Ukrainy (**zał. 5; poz. IID, 4**).

Od kilku lat jestem zaangażowana jako wykonawca lub główny wykonawca w projektach realizowanych w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, dotyczących badań nad udziałem czynnika genetycznego w niepłodności męskiej (**zał. 5; poz. II.I, 7, 9**). Mój wkład w badania dotyczy oceny jakości chromatyny plemników od niepłodnych mężczyzn z zaburzoną seminologią, ze szczególnym uwzględnieniem poziomu apoptozy. Jednym z celów prowadzonych badań jest poznanie mechanizmu/ów niepowodzeń rozrodu u nosicieli aberracji strukturalnych chromosomów. W badaniach przeprowadzonych na plemnikach nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych wykazano zaburzenia integralności chromatyny plemnikowej związane z wyższym stopniem fragmentacji plemnikowego DNA oraz wyższym poziomem deprotaminacji chromatyny plemnikowej (**zał. 5; poz. II.A, 11**). Z kolei u nosiciela kompleksowej rearanżacji chromosomowej t(9;10;11) nie znaleziono bezpośredniego związku pomiędzy strukturą chromatyny plemnikowej i brakiem sukcesu reprodukcyjnego (**zał. 5; poz. II.A, 16**). Badania te ujawniły wysoką heterogenność grupy nosicieli translokacji chromosomowych, w odniesieniu do stopnia integralności chromatyny plemników i sugerują konieczność stosowania kompleksowych badań genetycznych plemnika, dla określenia indywidualnego ryzyka niepowodzeń rozrodu związanego z daną translokacją. Druga część prowadzonych badań dotyczy wewnątrzjądrowej architektury ludzkich plemników. Najnowsze wyniki badań opublikowane w *Scientific Reports* wykazały, że wysoki poziom fragmentacji DNA plemników może być związany ze zmianą lokalizacji centromerów niektórych chromosomów w przestrzeni jądra komórkowego plemników (**zał. 5; poz. II.A, 21**). W ostatnim czasie badania nad udziałem czynnika genetycznego w niepłodności męskiej zostały rozszerzone o modyfikacje epigenetyczne związane między innymi z procesem metylacji plemnikowego DNA. Po raz pierwszy wykazano, że u nosicieli aberracji chromosomowych, niska integralność chromatyny plemników może mieć związek z nasileniem zjawiska globalnej hipometylacji plemnikowego DNA (**zał. 5; poz. II.A, 20**). Badania te są kontynuowane w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (SONATA 9), którego jestem wykonawcą (**zał. 5; poz. II.I, 10**). Celem projektu jest określenie wzorów metylacji wybranych genów kluczowych dla spermatogenezy w DNA plemników od niepłodnych mężczyzn i powiązanie ich z zaburzeniami integralności chromatyny plemnikowej.

Oprócz badań dotyczących biologii rozrodu, uczestniczyłam także w dwóch projektach realizowanych w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych poświęconych modyfikacjom genetycznym macierzystych komórek mięśniowych, w celu ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej (**zał. 5; poz. II.I, 3, 6**). Mój wkład w badania dotyczył określenia właściwości biologicznych transfekowanych komórek w kontekście ich przeżywalności w warunkach stresu oksydacyjnego, na potrzeby dokonania oceny efektywności wprowadzonych konstruktów genowych. Doświadczenia *in vitro* były prowadzone równolegle w dwóch układach komórkowych, na mysiej linii mioblastów C2C12 oraz na ludzkich macierzystych komórkach mięśni szkieletowych. W badaniach wykorzystano trzy konstrukcje genowe, w tym dwie dla czynników o właściwościach proangiogennych (kombinacja czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego z czynnikiem wzrostu fibroblastów-4, VEGF/FGF-4 oraz endotelialna syntaza tlenu azotu, eNOS) i jedną dla białka połączeń międzykomórkowych typu szczelinowego (koneksyna 43, Cx43). Badania wykazały potencjalny synergistyczny efekt nadekspresji VEGF/FGF-4 na

angiogenezę. Dla macierzystych komórek mięśniowych transfekowanych genem eNOS uzyskano obiecujące wyniki dotyczące ich właściwości biologicznych, molekularnych i funkcjonalnych, zwłaszcza wysokiej żywotności w sytuacji zaindukowanego stresu oksydacyjnego. Udowodniono także pozytywny efekt nadekspresji Cx 43 na stopień przeżycia i funkcję złącz szczelinowych mioblastów. Wyniki uzyskane w układzie *in vitro*, silnie wskazują na potencjalne możliwości wykorzystania ludzkich mioblastów modyfikowanych *ex vivo*, genami proangiogennymi i warunkującymi komunikację międzykomórkową, do regeneracji mięśnia sercowego po zawale, zwłaszcza w aspekcie polepszenia perfuzji okolicy pozawałowej i czynności skurczowej serca. Wyniki badań *in vitro*, w których uczestniczyłam, zostały opublikowane w formie trzech publikacji oryginalnych i anglojęzycznego rozdziału książkowego (**zał. 5; poz. IIA, 8, 12, 17, IID, 7**).

Moje najbliższe plany naukowo-badawcze są związane między innymi z realizacją projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (OPUS 10), którego jestem kierownikiem (**zał. 5; poz. II.I, 12**). Głównym celem badań jest zbadanie patomechanizmu odpowiedzialnego za rozwój subpłodności/niepłodności związanej z ekspozycją gonady męskiej na podwyższoną temperaturę. Badania kohortowe będą przeprowadzone w grupie 300 mężczyzn w wieku reprodukcyjnym. Projekt ten oferuje analizę szerokiego panelu konwencjonalnych i niekonwencjonalnych parametrów nasienia u mężczyzn narażonych na podwyższoną temperaturę jąder, zarówno pochodzenia klinicznego (żylaki powrózka, wnetrostwo) jak i środowiskowego (zawodowi kierowcy). Zbadane zostaną mechanizmy uszkodzające plemniki związane z apoptozą, stresem oksydacyjnym i reakcjami immunologicznymi. Ważnym celem badań będzie również znalezienie związku pomiędzy lokalną hipertermią i epigenetycznymi profilami plemników badanych mężczyzn.

Podsumowując, uczestniczyłam lub nadal uczestniczę w realizacji 12 projektów badawczych (w tym 2 jako kierownik). Poza omówionymi pracami oryginalnymi jestem autorem lub współautorem 8 prac przeglądowych. Dwie z nich, w których jestem współautorem, zostały nagrodzone przez Polskie Towarzystwo Biologii Komórki nagrodą im. Wacława Mayzla za najlepsze artykuły opublikowane w 2012 roku w *Postęпах Biologii Komórki*. Prace te są podsumowaniem wiedzy na temat zaburzeń protaminacji chromatyny plemnika. Spośród 4 rozdziałów książkowych z pierwszym autorstwem, szczególnie cenię sobie anglojęzyczny rozdział o powiązaniach czynników immunologicznych z układem oksydacyjno-redukcyjnym w męskim układzie moczowo-płciowym, zawarty w publikacji książkowej *Studies on Men's Health and Fertility. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*, pod redakcją Ashoka Agarwala, Johna Aitkena i Juana Alvareza. Rozdział ten znajduje się na liście publikacji bazy *Web of Science*. Jestem też współredaktorem numeru specjalnego prestiżowego czasopisma *Journal of Reproductive Immunology* (IF_{5-letni}=2,958). Jest to zbiór przeglądowych i oryginalnych prac wybitnych ekspertów, poświęcony różnym aspektom stanu zapalnego/infekcji w męskim układzie moczowo-płciowym. Ponadto jestem zaangażowana w międzynarodowym portalu recenzenckim *Faculty of 1000 in Medicine*, w którym razem z prof. M. Kurpiszem publikuję komentarze na temat kierunków badań we współczesnej andrologii. Jestem także recenzentem artykułów zgłoszonych do publikacji w następujących czasopismach: *Scientific Reports, Journal of Reproductive Immunology, Andrologia, Asian Journal of Andrology, Postępy Higieny i Medycyny*

Doświadczalnej, Postępy Andrologii - Online. Pełny wykaz wszystkich opublikowanych prac naukowych, doniesień konferencyjnych, spis wygłoszonych wykładów, a także informacji dotyczących działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzującej naukę zostały zamieszczone w załączniku nr 5.

Poznań, dnia 31.08.2016

Monika Frączek